
高田充歯科基礎医学奨励賞 受賞講演

エナメル質形成不全症の新規責任遺伝子変異の発見とその意義 —転写因子 *Sp6* をめぐるパズル—

三好 圭子

キーワード：エナメル質形成不全症，AMI，SP6，フレームシフト変異，アメロジェネシス

Novel Finding of Genetic Linkage between *Sp6* Mutation and Amelogenesis Imperfecta, and Beyond : Puzzles of Transcription Factor *Sp6*

Keiko MIYOSHI

Abstract : Tooth is one of the essential organs in our body, and plays the important roles to maintain and improve our quality of life (QOL). Regenerative medicine has been achieving the remarkable progress for several years, and tooth is also one of the hot research targets for regeneration therapy. To regenerate tooth, we need to understand whole tooth developmental program at molecular level. Reverse genetics has brought us many molecular details at the early stage of tooth development, however, the late stage of tooth development is not fully understood. We are now trying to elucidate the molecular paradigm on the development of dental epithelial cells.

During these studies, we found the new genetic linkage between amelogenesis imperfecta (AI) and a 2-bp insertional mutation of transcription factor *Sp6*, and proposed it as a new molecular diagnostic candidate for AI patients.

In this review, I would like to summarize about AI based on the responsible genes including current topics in the late stage of tooth development, and to discuss about what we can learn from those for regenerative tooth and future direction.

I. はじめに

「歯」は、咀嚼をはじめ、会話や感情表現によるコミュニケーション機能、脳機能の活性化や全身の健康とも関連が示唆されている「臓器」の一つであり、私たちの生活の質（Quality of Life ; QOL）の維持・向上に大きな役割を果たしている。しかし、生体の中で最も硬い組織であるエナメル質を持つ「歯」も、骨とは異なり、再生されることは無い。従って、何らかの原因で永久歯を失うと、私たちは床義歯やインプラント等の人工補綴物を装着しなければQOLを維持することは難しく、歯

の喪失はすべての人々が経験する可能性のある身近な問題である。

現在様々な臓器・組織の「再生医学・再生医療」が注目され、基礎研究が進められており、歯もそのターゲットの一つである。科学技術・学術審議会研究計画・評価分科会ならびにライフサイエンス委員会幹細胞・再生医学戦略作業部会による「iPS細胞研究のロードマップ」（平成25年2月1日付け）には、これからの10年間に「歯の再生」が肺等と並んで想定されており、国民のニーズの高さがうかがえる。

通常、臓器再生へのアプローチは本来の発生過程に学ぶことが多い。リバースジェネティクスによって多くのマウスモデルが作製されたことにより、歯の発生過程についても多くの関連遺伝子が同定されてきた^{1,2)}。しかし、歯の初期分化過程である歯胚形成期の分子同定が主流であり、後期分化過程であるエナメル質形成（アメロジェネシス）や歯根形成、萌出メカニズム等に関する分子レベルでの研究はやや遅れている。また一方で、同定された個々の分子についてもそれらの組織特異性、時空間的制御機構、分子間の相互作用や分子スイッチ等、未だ不明な点が多い。歯の再生を実現化するためには、歯の発生・分化過程の全体像を把握することが重要である。

私たちはこれまで、「歯の再生」を実現化するための基礎研究として、特にアメロジェネシスにつながる歯原性上皮細胞の分化機構に焦点を当て、研究を進めてきた³⁾。その過程で今回、エナメル質形成不全症モデルラットの新規責任遺伝子として、転写因子 *Specificity protein 6 (Sp6)* のフレームシフト変異を同定したので報告し、そこから見える課題と展望についてまとめた。

II. エナメル質形成不全症 (AI) と責任遺伝子

エナメル質形成不全症 (amelogenesis imperfecta, AI) は遺伝性疾患であり、その表現型はエナメル質に局限し、形態学的また機能的にエナメル質の形成不全を認める^{4,5)}。発症頻度は欧米で700人から14,000人に1人の頻度と報告されている^{6,7)}。表現型はバリエーションに富むが、現在一般に引用されている分類は1988年に出された Witkop の分類⁷⁾に基づき、低形成型、低成熟型、低石灰化型、タウロドンティズムを伴う低成熟-低形成型の4つに大きく分類される (表1)。

遺伝様式で分類すると、X連鎖優性または劣性、常染色体優性または劣性の4様式があり、現在ヒトの症例または実験動物で報告のある責任遺伝子についてまとめると、表2のようになる。

責任遺伝子には当初、*amelogenin*⁸⁻¹⁹⁾をはじめ、*ameloblastin*²⁰⁾、*enamelin*²¹⁻²⁹⁾、*MMP20*^{22,30-32)}、*KLK4*³³⁾といったエナメルマトリックスおよびその成熟に関わる分子の報告が中心であったが、その後、転写因子である *Dlx3*³⁴⁾ や、機能が不明の *Fam83h*³⁵⁻⁴¹⁾、*Wdr72*⁴²⁾、*Fam20a*⁴³⁻⁴⁵⁾ といった遺伝子の報告も見られるようになった。しかしながら、未だ半分以上の AI 患者症例で、責任遺伝子が不明である⁴⁶⁾。また、最近の報告では「他臓器の疾患を伴う AI」という表現の報告がふえており、例えば、*Fam20a* の変異では AI に加えてエナメル腎症候群 (ERS) や歯肉線維腫症候群 (AIGFS) を併発している症例が報告されている^{43,44)}。このような症例は、遺伝性疾患ではあるが、本来の AI の定義 (「classic」AI; 表現型は歯に局限) と異なるため、AI という表現が適切かどうか、難しいところである⁴⁶⁾。

表1 エナメル質形成不全症の分類
(modified from Witkop, 1989⁷⁾)

Witkop型	臨床所見	遺伝形式	エナメル質の厚み
I 形成不全型 (正常より薄いエナメル質)			
IA	形成不全、小窩	常/優	正常より薄い
IB	形成不全、限局性	常/優	正常より薄い
IC	形成不全、限局性	常/劣	正常より薄い
ID	形成不全、平滑	常/優	大変薄くコンタクトなし
IE	形成不全、平滑	X/優	薄くコンタクトなし
IF	形成不全、粗	常/優	薄くコンタクトなし
IG	エナメル質欠損	常/劣	薄くコンタクトなし
II 低成熟型 (正常な厚み/斑/折れ易い)			
IIA	低成熟、着色	常/劣	正常
IIB	低成熟	X/劣	正常
IIC	雪帽子形歯	X	正常
IID	雪帽子形歯	常/優?	正常
III 低石灰化型			
IIIA	低石灰化型	常/優	初期正常、急速に咬耗
IIIB	低石灰化型	常/劣	初期正常、特に急速に咬耗
IV タウロドンティズムを伴う低成熟・形成不全型			
IVA	低成熟、低形成	?	正常?
IVB	低形成、低成熟	?	薄い

表2 原因遺伝子に基づいたエナメル質形成不全症の分類のまとめ

遺伝様式	遺伝子	ヒト染色体	ヒト症例報告	合併症	参考文献
X連鎖	AMELX	X	有		8-19)
	AMBN	4	なし		20)
	ENAM	4	有		21-27)
	DLX3	17	有		34)
	FAM83H	8	有		35-41)
常染色体優性	ENAM	4	有		28,29)
	MMP20	11	有		26,30-32)
	KLK4	19	有		33)
	WDR72	15	有		42)
	FAM20A	17	有	ERS, GFS	43-45)
	SP6	17	なし		67)
	C4orf26	4	有		54)
	SLC24A4	14	有		61)
	LAMA3	18	有	JEB-nH	52)
	STIM1	11	有	Immunodeficiency and autoimmunity	59)
	ORA1	12	有	Immunodeficiency, myopathy, ectodermal dysplasia	60)
	SLC4A4 (NBCE1)	4	有	permanent isolated pRTA with ocular abnormalities	62,63)
	TP63	3	有	Split Hand-Split Foot-ectodermal dysplasia	58)
	COL17A1	10	有	JEB-nH	55,57)
	SLC4A2 (AE2)	7	なし		64)
常染色体劣性	FOXO1	13	なし		53)
	ITGB6	2	なし		56)

*ERS, Enamel-renal syndrome; GFS, Gingival fibromatosis syndrome; JEB-nH, Junctional epidermolysis bullosa, non-Herlitz; pRTA, proximal renal tubular acidosis

最近、ゲノムワイドの発現遺伝子プロファイリングが可能となり、とくにアメロジェネシスの後期分化段階においてエナメル芽細胞内で起こっているイベントに関する、分子レベルの網羅的解析が進みはじめている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。そこで本稿では、エナメル芽細胞の分化段階として、幹細胞から TA 期の細胞を経て内エナメル上皮、前エナメル芽細胞、分泌期エナメル芽細胞までを初期分化過程、移行期エナメル芽細胞から成熟期エナメル芽細胞、退縮エナメル上皮に至るまでを後期分化過程と定義し、稿を進めたい。後期分化ではエナメル芽細胞が、エナメルタンパク質の合成期から、電解質の輸送やタンパク質の分解、さらに水やタンパク質の脱却を行い、エナメル質の硬化を促進する過程に相当する。例えば細胞内カルシウムイオン濃度を調節するために ER 膜に存在する STIM1 は ER 内の貯蔵カルシウムイオン濃度が低下するとコンフォメーション変換により細胞膜に存在する ORAI1 のポア形成を通してカルシウムイオンを流入させる^{50, 51)}。また、Slc24a4 はナトリウム-カルシウム exchanger としてイオンの調節に一役買っており、AI の原因候補遺伝子とされたが、表 2 に示すようにヒトでも STIM1, ORAI1, Slc24a4 の遺伝子変異は他の疾患とともに AI を併発していることが報告された⁵⁹⁻⁶¹⁾。さらに重炭酸イオンの調節に関わっている SLC4A4 (NBCe1) と SLC4A2 (AE2) の変異もヒトまたはマウスで AI を発症することが報告されている⁶²⁻⁶⁴⁾。このように他臓器と AI が関連してくると、現在責任遺伝子が不明の患者症例に対し、新たな診断基準や治療法が生み出される可能性があると考えられる。エナメル芽細胞分化後期過程での分子メカニズムの解明は、今、新しい局面を迎えはじめている。

Ⅲ. AI モデルラット：AMI

私たちが研究に用いたモデルラット AMI は、Stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR-SP 系) のコロニーから自然発症した AI モデルラットである⁶⁵⁾。表現型は切歯がチョーク様白色で硬度に欠け、簡単に摩耗する、低形成型の AI である^{65, 66)}。げっ歯類の切歯はヒトと異なり、正常なエナメル質形成が行われると鉄の沈着に伴い黄色く着色することが知られており、エナメル質の形成が不全であると白色を呈するため、容易に判別できる（図 1）。組織学的にはエナメル芽細胞分化が不十分で、分泌期～成熟期エナメル芽細胞が極端に少なく、退縮期エナメル芽細胞が多い^{66, 67)}。また分泌期～成熟期エナメル芽細胞は、極性はあるが細胞の高さが低く不揃いで、核が必ずしも基底側に局在せず、エナメル芽細胞分化が異常である。この AMI ラットの遺伝様式は常染色体劣性であるが、責任遺伝子は不明であった。

そこで、生後 7 日の AMI ラット大白歯から全 RNA およびゲノム DNA を抽出し、既知の AI 責任遺伝子についてシーケンス解析した結果、すべて正常である

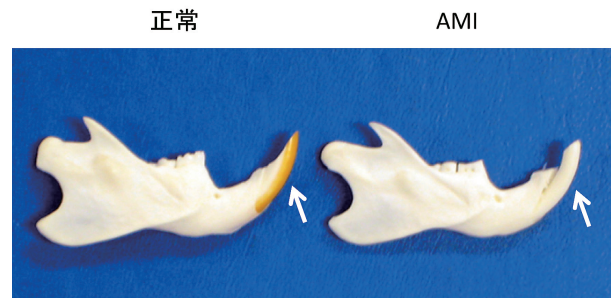


図 1 正常ラットおよびエナメル質形成不全症ラット AMI の下顎写真

正常ラットでは切歯の唇側にエナメル質の形成に伴う黄色い着色が認められるが、AMI ラットではエナメル質形成不全のため、切歯の唇側は白色である（矢印）。

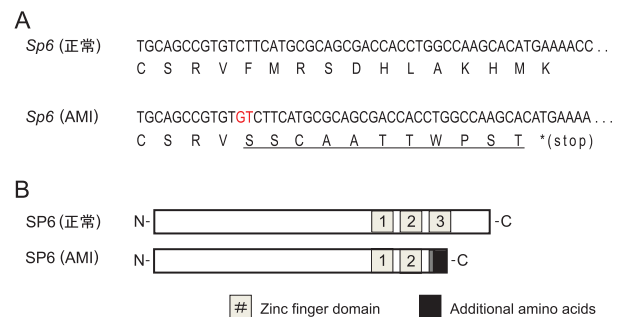


図 2 AMI で見つかった SP6 のフレームシフト変異

A. 正常および AMI ラットの Sp6 の塩基配列（上段）とアミノ酸配列（下段）。AMI ラットの Sp6 には 2 bp の塩基挿入（朱書き）により、フレームシフト変異が生じた結果、新規 11 アミノ酸（下線部）が翻訳されて新規終止コドン（*）で終結する。

B. SP6 タンパク質の構造の模式図。C 末側のボックスはジンクフィンガーモチーフを示す。黒いボックスは A で下線を引いた部分に相当する。

ことを確認した⁶⁷⁾。さらにアメロジェネシスに関わる重要な遺伝子群について解析を進めた結果、これまで当研究室で研究を進めてきた転写因子 Sp6 の翻訳領域に 2 bp の塩基挿入があることを発見した（図 2 A）⁶⁷⁾。その結果、SP6 タンパク質は DNA 結合部位と考えられている 3 つのジンクフィンガードメインのうち、3 番目のジンクフィンガードメインがフレームシフト変異により破壊され、新規の 11 アミノ酸の付加を伴った変異型として翻訳される（図 2 B）。この Sp6 遺伝子変異のホモ変異体（以下 Ami/Ami と表記）と AI の表現型の相関についてリンケージ解析を行った結果、ロッド値 35.46 となり、非常に強い相関関係があることが示された⁶⁷⁾。

次に、この表現型をレスキューするため、まず CMV

表3 AMI ラットと *Sp6* 欠失マウスでの表現型の比較

組織	項目	AMI ラット ^{65,66,67)}	<i>Sp6</i> 欠失マウス ^{75,76,80)}
歯	萌出のタイミング	正常	遅延
	数	正常	過剰
	エナメル質	薄い、石灰化	なし〜薄い
	エナメル芽細胞		
	①核の局在	極性あり	極性なし
体毛	②トームスの突起	なし	非定型
	③形態学的な分化	異常	欠失
		正常	脱毛
口ひげ	新生仔	巻き毛	短い〜脱毛
	成体	正常	萌出遅延
手指		正常	合指〜欠損

分化にも深く関与していることを示唆している。

この SP6 の機能を探るため、私たちは生後 6 日目のラット下顎前歯の TA 領域から前エナメル芽細胞あたりの細胞群から歯原性上皮細胞を分離・培養し、Limiting dilution により樹立した歯原性上皮細胞クローンである G5 細胞⁸²⁾ を用いて、まず SP6 を恒常的に過剰発現させた C9 細胞を樹立し、SP6 の標的因子をマイクロアレイにて網羅的に解析した⁶⁸⁾。その結果、BMP シグナルのアンタゴニストであるフォリスタチンの発現が、SP6 によって抑制されていることを発見した⁶⁸⁾。これはエナメル芽細胞分化が BMP シグナルにより厳密に制御されていることと一致し^{83, 84)}、SP6 がネガティブレギュレーターを制御することによってアメロジェネシスに関与していることが示唆された。

また一方で、この C9 細胞の維持培養の過程から SP6 タンパク質が半減期の短いタンパク質であり、プロテアソーム系の分解システムにより制御されていることを明らかにするとともに、C9 細胞、G5 細胞のプロテアソーム活性が高いことを見出した⁸⁵⁾。このタンパク質の特性とプロテアソーム活性は、AMI のレスキュー実験において、本来発現すべき細胞に SP6 を過剰発現させられなかったこと、言い換えれば変異型 SP6 と正常型 SP6 を共存させることはできなかったことと何らかの関係がある可能性が考えられる。

さらにプロテアソーム阻害剤である MG132 と *Sp6* の siRNA を組み合わせて SP6 の発現をコントロールすることにより SP6 の標的遺伝子を検索したところ、エナメルタンパク質の一つである *amelotin* や、細胞極性に重要な *Rock1* の発現に影響を及ぼしていることが示唆された⁸⁵⁾。変異型 SP6 が正常型と異なる活性を持つのであれば、AI の表現型が説明できるかもしれない。そこで、SP6 の構造と活性の相関について現在解析中である。

興味深いことに、最近、常染色体劣性遺伝様式の骨形成不全症の患者症例で、転写因子 *Sp7* に 1 塩基挿入のフレームシフト変異が原因であることが報告された⁸⁶⁾。この変異では私たちの AMI と同様にフレームシフトにより 3 番目のジンクフィンガーが破壊されていた。*Sp7* の欠失マウスモデル⁸⁷⁾ は *Runx2* の欠失マウスモデル⁸⁸⁾ と

同様に、全身の骨形成ができない重篤な表現型であることに對し、フレームシフト変異はややマイルドである点では、*Sp6* の場合と類似している。従って、3 番目のジンクフィンガー（または変異型）は細胞特異的な機能を担っている可能性がある。

Sp/KLF ファミリーの C 末端の 3 つのジンクフィンガードメインについては、DNA の結合能は 2 番目および 3 番目のジンクフィンガーが強く関与しており^{89, 91)}、1 番目のジンクフィンガーは E2F や HDAC1, p300 などと相互作用することによりその転写活性化能と DNA 結合能を制御されているという報告がある⁹²⁻⁹⁴⁾。変異型 SP6 では 3 番目のジンクフィンガードメインが破壊されていることから、DNA 結合能への影響が懸念されるとともに、タンパク質相互作用についても検討する必要がある。

V. 転写因子 *Sp6* の発現制御機構

SP6 タンパク質の細胞特異性の高い発現様式は、mRNA レベルでも制御を受けている。mRNA の発現機構を解明することは、同時に細胞特異性を規定する分子メカニズムを解明することにつながるため、大変重要である。

そこで、*Sp6* の発現調節機構を調べるために、まずマウス胎仔下顎（胎生 18.5 日）の臼歯の全 RNA を用いて 5' RACE を行った。その結果、*Sp6* 遺伝子は 2 つの転写開始点を有することを見出し、それぞれ exon 1a および exon 1b と名付けた⁹⁵⁾。これらのプロモーター領域にはいずれも TATA box がなく、TATA-less プロモーターであることも見出した⁹⁵⁾。さらにプロモーター解析の結果から、これらのプロモーター活性には細胞特異性があること、また第 3 のプロモーターの存在する可能性を示唆する結果を得た⁹⁵⁾。ところが *Sp6* の 5' 末端については、他の 2 つのグループが独立して解析を行い、exon 1a または exon 1b に相当する exon を、それぞれ単一の「exon 1」として報告している^{69, 96)}。具体的には、マウス胎仔（胎生 19.5 日）の臼歯の全 RNA を用いて 5' RACE 解析を行ったグループは、TATA box を伴う転写開始点を exon 1a より 33bp 下流の位置に報告している⁶⁹⁾。一方、testis の全 RNA を用いて解析したグループでは、exon 1a より約 5.2kb 下流に、TATA-less の exon 1b のみを報告した⁹⁶⁾。このように、遺伝子構造に関して異なる報告が存在することから、真の転写開始点の同定は *Sp6* の発現調節機構を探る上で解明すべき必須の課題である。

また、別の *Sp6* の発現調節機構として、*Sp6* には「*opposite strand Sp6*」と名付けられた antisense RNA が存在することが報告された⁹⁶⁾。これは *Sp6* の組織特異的・時間特異的な転写が、プロモーター以外の理由で調節されていることを示唆している。

一方、私たちは *Sp6* の発現を制御する因子として、Wnt1 と BMP2 が活性化因子である可能性を報告した⁹⁵⁾。さらに最近、転写因子 Bcl11b/CTIP2 が *Sp6* プロモーター

に直接結合することも報告された⁹⁷⁾が、*Sp6*の転写調節に機能的に関与しているかどうかは不明であり、これについては現在私たちも検討中である。

VI. おわりに

細胞の運命決定は多くの場合、転写因子がその司令塔である。しかしながら「歯のマスター遺伝子」となり得る転写因子は未だわかっていない。

今回私たちはAIの新規責任遺伝子として転写因子*Sp6*の変異を発見し、新たなAI患者の遺伝子診断の候補遺伝子として報告した。*Sp6*は歯だけでなく毛、肺、肢芽においても重要な役割を担っていることから、マスター遺伝子というよりはむしろ主要な調節遺伝子の1つとして、組織・細胞特異的に、時空間的制御を厳密に受けながら標的遺伝子をコントロールしていると考えられる。

歯における*Sp6*の特異性を追求することで、歯の発生・分化プロセスの全貌の理解に努め、歯の再生や遺伝性疾患の新たな治療法の開発等につなげていきたい。

VII. 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御高閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子医化学分野 野間隆文教授に深く感謝いたします。また、受賞対象となりましたAI原因遺伝子としての*Sp6*遺伝子変異に関する研究は、当分子医化学分野の野間教授、武藤博士（現理研CDB）、堀口助教、萩田技術員との共同研究の成果であり、谷村助教及び大学院生、総研のみなさんの御支援によるものです。この場をお借りして感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Bei M: Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev* 19, 504-510 (2009)
- 2) Thesleff I: Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116, 1647-1648 (2003)
- 3) 野間隆文: iPS細胞を用いた臨床応用の基礎と課題. *四国歯学会雑誌* 24 (2), 59-68 (2012)
- 4) Crawford P J, Aldred M and Bloch-Zupan A: Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2, 17 (2007)
- 5) Urzua B, Ortega-Pinto A, Morales-Bozo I, Rojas-Alcayaga G and Cifuentes V: Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet* 49, 104-121 (2011)
- 6) Backman B and Holm A K: Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish county. *Community Dent Oral Epidemiol* 14, 43-47 (1986)
- 7) Witkop C J, Jr.: Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol* 17, 547-553 (1988)
- 8) Sekiguchi H, Tanakamaru H, Minaguchi K, Machida Y and Yakushiji M: A case of amelogenesis imperfecta of deciduous and all permanent teeth. *Bull Tokyo Dent Coll* 42, 45-50 (2001)
- 9) Lench N J and Winter G B: Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Mutat* 5, 251-259 (1995)
- 10) Lench N J, Brook A H and Winter G B: SSCP detection of a nonsense mutation in exon 5 of the amelogenin gene (AMGX) causing X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Mol Genet* 3, 827-828 (1994)
- 11) Lagerstrom-Fermer M, Nilsson M, Backman B, Salido E, Shapiro L, Pettersson U and Landegren U: Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics* 26, 159-162 (1995)
- 12) Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U and Pettersson U: A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 10, 971-975 (1991)
- 13) Kindelan S A, Brook A H, Gangemi L, Lench N, Wong F S, Fearn J, Jackson Z, Foster G and Stringer B M: Detection of a novel mutation in X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 79, 1978-1982 (2000)
- 14) Kim J W, Simmer J P, Hu Y Y, Lin B P, Boyd C, Wright J T, Yamada C J, Rayes S K, Feigal R J and Hu J C: Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 83, 378-383 (2004)
- 15) Hart S, Hart T, Gibson C and Wright J T: Mutational analysis of X-linked amelogenesis imperfecta in multiple families. *Arch Oral Biol* 45, 79-86 (2000)
- 16) Hart P S, Aldred M J, Crawford P J, Wright N J, Hart T C and Wright J T: Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Arch Oral Biol* 47, 261-265 (2002)
- 17) Greene S R, Yuan Z A, Wright J T, Amjad H, Abrams W R, Buchanan J A, Trachtenberg D I and Gibson C W: A new frameshift mutation encoding a truncated amelogenin leads to X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 47, 211-217 (2002)
- 18) Collier P M, Sauk J J, Rosenbloom S J, Yuan Z A and Gibson C W: An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 42, 235-242 (1997)
- 19) Aldred M J, Crawford P J, Roberts E and Thomas N S:

- Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Genet* 90, 413-416 (1992)
- 20) Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach P H, Nanci A, Kulkarni A B and Yamada Y: Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167, 973-983 (2004)
- 21) Rajpar M H, Harley K, Laing C, Davies R M and Dixon M J: Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 10, 1673-1677 (2001)
- 22) Ozdemir D, Hart P S, Ryu O H, Choi S J, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, Piesco N and Hart T C: MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 84, 1031-1035 (2005)
- 23) Ozdemir D, Hart P S, Firatli E, Aren G, Ryu O H and Hart T C: Phenotype of ENAM mutations is dosage-dependent. *J Dent Res* 84, 1036-1041 (2005)
- 24) Mardh C K, Backman B, Holmgren G, Hu J C, Simmer J P and Forsman-Semb K: A nonsense mutation in the enamelin gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2). *Hum Mol Genet* 11, 1069-1074 (2002)
- 25) Kim J W, Seymen F, Lin B P, Kiziltan B, Gencay K, Simmer J P and Hu J C: ENAM mutations in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 84, 278-282 (2005)
- 26) Kida M, Ariga T, Shirakawa T, Oguchi H and Sakiyama Y: Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res* 81, 738-742 (2002)
- 27) Kang H Y, Seymen F, Lee S K, Yildirim M, Tuna E B, Patir A, Lee K E and Kim J W: Candidate gene strategy reveals ENAM mutations. *J Dent Res* 88, 266-269 (2009)
- 28) Hart T C, Hart P S, Gorry M C, Michalec M D, Ryu O H, Uygur C, Ozdemir D, Firatli S, Aren G and Firatli E: Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects. *J Med Genet* 40, 900-906 (2003)
- 29) Gutierrez S J, Chaves M, Torres D M and Briceno I: Identification of a novel mutation in the enamelin gene in a family with autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 52, 503-506 (2007)
- 30) Papagerakis P, Lin H K, Lee K Y, Hu Y, Simmer J P, Bartlett J D and Hu J C: Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 87, 56-59 (2008)
- 31) Lee S K, Seymen F, Kang H Y, Lee K E, Gencay K, Tuna B and Kim J W: MMP20 hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 89, 46-50 (2010)
- 32) Kim J W, Simmer J P, Hart T C, Hart P S, Ramaswami M D, Bartlett J D and Hu J C: MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 42, 271-275 (2005)
- 33) Hart P S, Hart T C, Michalec M D, Ryu O H, Simmons D, Hong S and Wright J T: Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 41, 545-549 (2004)
- 34) Dong J, Amor D, Aldred M J, Gu T, Escamilla M and MacDougall M: DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A* 133A, 138-141 (2005)
- 35) Wright J T, Frazier-Bowers S, Simmons D, Alexander K, Crawford P, Han S T, Hart P S and Hart T C: Phenotypic variation in FAM83H-associated amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 88, 356-360 (2009)
- 36) Lee S K, Hu J C, Bartlett J D, Lee K E, Lin B P, Simmer J P and Kim J W: Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. *Hum Mutat* 29, E95-99 (2008)
- 37) Kim J W, Lee S K, Lee Z H, Park J C, Lee K E, Lee M H, Park J T, Seo B M, Hu J C and Simmer J P: FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 82, 489-494 (2008)
- 38) Hyun H K, Lee S K, Lee K E, Kang H Y, Kim E J, Choung P H and Kim J W: Identification of a novel FAM83H mutation and microhardness of an affected molar in autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Int Endod J* 42, 1039-1043 (2009)
- 39) Haubek D, Gjørup H, Jensen L G, Juncker I, Nyegaard M, Borglum A D, Poulsen S and Hertz J M: Limited phenotypic variation of hypocalcified amelogenesis imperfecta in a Danish five-generation family with a novel FAM83H nonsense mutation. *Int J Paediatr Dent* 21, 407-412 (2011)
- 40) Hart P S, Becerik S, Cogulu D, Emingil G, Ozdemir-Ozenen D, Han S T, Sulima P P, Firatli E and Hart T C: Novel FAM83H mutations in Turkish families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Clin Genet* 75, 401-404 (2009)
- 41) El-Sayed W, Shore R C, Parry D A, Inglehearn C F and Mighell A J: Ultrastructural analyses of deciduous teeth affected by hypocalcified amelogenesis imperfecta from a family with a novel Y458X FAM83H nonsense mutation. *Cells Tissues Organs* 191, 235-239 (2010)
- 42) El-Sayed W, Parry D A, Shore R C, Ahmed M, Jafri

- H, Rashid Y, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Kirkham J, Inglehearn C F and Mighell A J: Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturational amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 85, 699-705 (2009)
- 43) Wang S K, Aref P, Hu Y, Milkovich R N, Simmer J P, El-Khateeb M, Daggag H, Baqain Z H and Hu J C: FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genet* 9, e1003302 (2013)
 - 44) O'Sullivan J, Bitu C C, Daly S B, Urquhart J E, Barron M J, Bhaskar S S, Martelli-Junior H, dos Santos Neto P E, Mansilla M A, Murray J C, Coletta R D, Black G C and Dixon M J: Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet* 88, 616-620 (2011)
 - 45) Cho S H, Seymen F, Lee K E, Lee S K, Kweon Y S, Kim K J, Jung S E, Song S J, Yildirim M, Bayram M, Tuna E B, Gencay K and Kim J W: Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 33, 91-94 (2011)
 - 46) Wright J T, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred M J, Hart P S and Hart T C: Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs* 194, 279-283 (2011)
 - 47) Lacruz R S, Smith C E, Chen Y B, Hubbard M J, Hacia J G and Paine M L: Gene-expression analysis of early- and late-maturation-stage rat enamel organ. *Eur J Oral Sci* 119 Suppl 1, 149-157 (2011)
 - 48) Lacruz R S, Smith C E, Bringas P, Jr., Chen Y B, Smith S M, Snead M L, Kurtz I, Hacia J G, Hubbard M J and Paine M L: Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol* 227, 2264-2275 (2012)
 - 49) Lacruz R S, Smith C E, Kurtz I, Hubbard M J and Paine M L: New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts. *J Dent Res* 92, 122-129 (2013)
 - 50) Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S H, Tanasa B, Hogan P G, Lewis R S, Daly M and Rao A: A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185 (2006)
 - 51) Feske S: *ORAI1* and *STIM1* deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev* 231, 189-209 (2009)
 - 52) Yuen W Y, Pasmooij A M, Stellingsma C and Jonkman M F: Enamel defects in carriers of a novel *LAMA3* mutation underlying epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol* 92, 695-696 (2012)
 - 53) Poche R A, Sharma R, Garcia M D, Wada A M, Nolte M J, Udan R S, Paik J H, DePinho R A, Bartlett J D and Dickinson M E: Transcription factor *FoxO1* is essential for enamel biomineralization. *PLoS One* 7, e30357 (2012)
 - 54) Parry D A, Brookes S J, Logan C V, Poulter J A, El-Sayed W, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Sayed J, Raif el M, Shore R C, Dashash M, Barron M, Morgan J E, Carr I M, Taylor G R, Johnson C A, Aldred M J, Dixon M J, Wright J T, Kirkham J, Inglehearn C F and Mighell A J: Mutations in *C4orf26*, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 91, 565-571 (2012)
 - 55) Murrell D F, Pasmooij A M, Pas H H, Marr P, Klingberg S, Pfendner E, Uitto J, Sadowski S, Collins F, Widmer R and Jonkman M F: Retrospective diagnosis of fatal *BP180*-deficient non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa suggested by immunofluorescence (IF) antigen-mapping of parental carriers bearing enamel defects. *J Invest Dermatol* 127, 1772-1775 (2007)
 - 56) Mohazab L, Koivisto L, Jiang G, Kytomaki L, Haapasalo M, Owen G R, Wiebe C, Xie Y, Heikinheimo K, Yoshida T, Smith C E, Heino J, Hakkinen L, McKee M D and Larjava H: Critical role for α v β 6 integrin in enamel biomineralization. *J Cell Sci* 126, 732-744 (2012)
 - 57) McGrath J A, Gatalica B, Li K, Dunnill M G, McMillan J R, Christiano A M, Eady R A and Uitto J: Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol* 148, 1787-1796 (1996)
 - 58) Kantaputra P N, Matangkasombut O and Sripathomsawat W: Split hand-split foot-ectodermal dysplasia and amelogenesis imperfecta with a *TP63* mutation. *Am J Med Genet A* 158A, 188-192 (2011)
 - 59) Picard C, McCarl C A, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, LeDeist F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A and Feske S: *STIM1* mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 360, 1971-1980 (2009)
 - 60) McCarl C A, Picard C, Khalil S, Kawasaki T, Rother J, Papolos A, Kutok J, Hivroz C, Ledeist F, Plogmann K, Ehl S, Notheis G, Albert M H, Belohradsky B H, Kirschner J, Rao A, Fischer A and Feske S: *ORAI1* deficiency and lack of store-operated Ca^{2+} entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1311-1318 e1317 (2009)

- 61) Parry D A, Poulter J A, Logan C V, Brookes S J, Jafri H, Ferguson C H, Anwari B M, Rashid Y, Zhao H, Johnson C A, Inglehearn C F and Mighell A J: Identification of mutations in SLC24A4, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 92, 307-312 (2013)
- 62) Inatomi J, Horita S, Braverman N, Sekine T, Yamada H, Suzuki Y, Kawahara K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Shimadzu M, Endou H, Fujita T, Seki G and Igarashi T: Mutational and functional analysis of SLC4A4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch* 448, 438-444 (2004)
- 63) Dinour D, Chang M H, Satoh J, Smith B L, Angle N, Knecht A, Serban I, Holtzman E J and Romero M F: A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J Biol Chem* 279, 52238-52246 (2004)
- 64) Lyaruu D M, Bronckers A L, Mulder L, Mardones P, Medina J F, Kellokumpu S, Oude Elferink R P and Everts V: The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol* 27, 119-127 (2008)
- 65) Ishibashi K, Iino T and Sekiguchi F: Amelogenesis imperfecta, a new dental mutation in rats. *Lab Anim Sci* 40, 16-20 (1990)
- 66) Terashima T, Baba O, Takano Y, Ishibashi K and Oida S: Analysis of enamel formation in mutant rats with hypoplastic type of amelogenesis imperfecta. *Dentistry in Japan* 39, 8-14 (2003)
- 67) Muto T, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H and Noma T: Novel genetic linkage of rat Sp6 mutation to Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 7, 34 (2012)
- 68) Ruspita I, Miyoshi K, Muto T, Abe K, Horiguchi T and Noma T: Sp6 downregulation of follistatin gene expression in ameloblasts. *J Med Invest* 55, 87-98 (2008)
- 69) Nakamura T, Unda F, de-Vega S, Vilaxa A, Fukumoto S, Yamada K M and Yamada Y: The Kruppel-like factor epiprofin is expressed by epithelium of developing teeth, hair follicles, and limb buds and promotes cell proliferation. *J Biol Chem* 279, 626-634 (2004)
- 70) Bouwman P and Philipsen S: Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38 (2002)
- 71) Suske G, Bruford E and Philipsen S: Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85, 551-556 (2005)
- 72) Li L and Davie J R: The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat* 192, 275-283 (2010)
- 73) Supp D M, Witte D P, Branford W W, Smith E P and Potter S S: Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 176, 284-299 (1996)
- 74) Treichel D, Becker M B and Gruss P: The novel transcription factor gene Sp5 exhibits a dynamic and highly restricted expression pattern during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 101, 175-179 (2001)
- 75) Nakamura T, de Vega S, Fukumoto S, Jimenez L, Unda F and Yamada Y: Transcription factor epiprofin is essential for tooth morphogenesis by regulating epithelial cell fate and tooth number. *J Biol Chem* 283, 4825-4833 (2008)
- 76) Talamillo A, Delgado I, Nakamura T, de-Vega S, Yoshitomi Y, Unda F, Birchmeier W, Yamada Y and Ros M A: Role of Epiprofin, a zinc-finger transcription factor, in limb development. *Dev Biol* 337, 363-374 (2010)
- 77) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng J M, Behringer R R and de Crombrughe B: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29 (2002)
- 78) Yagi K, Tsuji K, Nifuji A, Shinomiya K, Nakashima K, DeCrombrughe B and Noda M: Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J Cell Biochem* 88, 1077-1083 (2003)
- 79) Kawakami Y, Esteban C R, Matsui T, Rodriguez-Leon J, Kato S and Izpisua Belmonte J C: Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* 131, 4763-4774 (2004)
- 80) Hertveldt V, Louryan S, van Reeth T, Dreze P, van Vooren P, Szpirer J and Szpirer C: The development of several organs and appendages is impaired in mice lacking Sp6. *Dev Dyn* 237, 883-892 (2008)
- 81) Ibarretxe G, Aurrekoetxea M, Crende O, Badiola I, Jimenez-Rojo L, Nakamura T, Yamada Y and Unda F: Epiprofin/Sp6 regulates Wnt-BMP signaling and the establishment of cellular junctions during the bell stage of tooth development. *Cell Tissue Res* 350, 95-107 (2012)
- 82) Abe K, Miyoshi K, Muto T, Ruspita I, Horiguchi T, Nagata T and Noma T: Establishment and characterization of rat dental epithelial derived ameloblast-lineage clones. *J Biosci Bioeng* 103, 479-485 (2007)
- 83) Wang X P, Suomalainen M, Jorgez C J, Matzuk M M, Werner S and Thesleff I: Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 7, 719-730 (2004)

- 84) Wang X P, Suomalainen M, Jorgez C J, Matzuk M M, Wankell M, Werner S and Thesleff I: Modulation of activin/bone morphogenetic protein signaling by follistatin is required for the morphogenesis of mouse molar teeth. *Dev Dyn* 231, 98-108 (2004)
- 85) Utami T W, Miyoshi K, Hagita H, Yanuarieska R D, Horiguchi T and Noma T: Possible linkage of SP6 transcriptional activity with amelogenesis by protein stabilization. *J Biomed Biotechnol* 2011, 320987 (2011)
- 86) Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin J A, Valencia M, Leton R, Martinez-Glez V, Elhossini R, Amr K, Vilaboa N and Ruiz-Perez V L: Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 87, 110-114 (2010)
- 87) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng J M, Behringer R R and de Crombrughe B: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29 (2002)
- 88) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson R T, Gao Y H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S and Kishimoto T: Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764 (1997)
- 89) Yokono M, Saegusa N, Matsushita K and Sugiura Y: Unique DNA binding mode of the N-terminal zinc finger of transcription factor Sp1. *Biochemistry* 37, 6824-6832 (1998)
- 90) Uno Y, Matsushita K, Nagaoka M and Sugiura Y: Finger-positional change in three zinc finger protein Sp1: influence of terminal finger in DNA recognition. *Biochemistry* 40, 1787-1795 (2001)
- 91) Lee J A, Suh D C, Kang J E, Kim M H, Park H, Lee M N, Kim J M, Jeon B N, Roh H E, Yu M Y, Choi K Y, Kim K Y and Hur M W: Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *J Biol Chem* 280, 28061-28071 (2005)
- 92) Rotheneder H, Geymayer S and Haidweger E: Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* 293, 1005-1015 (1999)
- 93) Matsumura T, Suzuki T, Aizawa K, Munemasa Y, Muto S, Horikoshi M and Nagai R: The deacetylase HDAC1 negatively regulates the cardiovascular transcription factor Kruppel-like factor 5 through direct interaction. *J Biol Chem* 280, 12123-12129 (2005)
- 94) Schuetz A, Nana D, Rose C, Zocher G, Milanovic M, Koenigsmann J, Blasig R, Heinemann U and Carstanjen D: The structure of the Klf4 DNA-binding domain links to self-renewal and macrophage differentiation. *Cell Mol Life Sci* 68, 3121-3131 (2011)
- 95) Arie Wahyudi I, Horiguchi T, Miyoshi K, Muto T, Utami T W, Hagita H and Noma T: Isolation and Characterization of Mouse Specificity Protein 6 Promoter. *Indonesian J Dent Res* 1, 21-34 (2010)
- 96) Hertveldt V, De Mees C, Scohy S, Van Vooren P, Szpirer J and Szpirer C: The Sp6 locus uses several promoters and generates sense and antisense transcripts. *Biochimie* 89, 1381-1387 (2007)
- 97) Golonzhka O, Metzger D, Bornert J M, Bay B K, Gross M K, Kioussi C and Leid M: Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4278-4283 (2009)